

**PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES α , α'
ET β DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS**

L'invention concerne des petits ARN interférents (*small interfering RNA* ou *silencing inducing RNA*), dénommés ci-après siRNA, spécifiques des sous-unités α , α' et β de la protéine kinase CK2 (ou caséine kinase 2) et leurs applications, notamment pour le traitement des cancers.

La protéine CK2 (ou caséine kinase 2) est une sérine/thréonine kinase pléiotrope et ubiquitaire, très conservée chez les eucaryotes ; cette holoenzyme est composée de deux sous-unités catalytiques α et α' et de deux sous-unités régulatrices β identiques associées en hétérotétramères $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha'_2\beta_2$ ou $\alpha_2\beta_2$.

Cette protéine joue un rôle essentiel dans le contrôle de nombreux processus physiopathologiques ; elle est indispensable au développement embryonnaire et à la différenciation terminale, ainsi qu'au contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la survie cellulaire et son expression est dérégulée dans de nombreux cancers incluant des tumeurs d'origine virale où elle participe au blocage de l'apoptose (Buchou et al., Mol. Cell. Biol., 2003, 23, 908-915 ; Ahmed et al., Trends in Cell Biology, 2002, 12, 226-230).

Du fait de son rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques et de l'importance des pathologies associées à son dysfonctionnement, la protéine CK2 représente une nouvelle cible pharmacologique pour le développement de médicaments, notamment des anti-cancéreux et des anti-viraux.

Toutefois, étant donné que l'invalidation des gènes des sous-unités de la CK2 est létale chez les souris transgéniques « knock-out » et non compatible avec la viabilité cellulaire (Buchou et al., précité), le développement de telles molécules est resté très limité en l'absence de modèle *in vivo* ou *in vitro* permettant l'analyse fonctionnelle du rôle des sous-unités de la CK2.

En effet, les quelques molécules capables d'inhiber la CK2 qui ont été décrites présentent l'inconvénient d'être, soit peu spécifiques, soit peu actives, à savoir :

- des petites molécules analogues de l'ATP capables d'inhiber spécifiquement les sous-unités catalytiques α et α' ; on peut citer comme analogue de

l'ATP, le TBB (Sarno et al., FEBS lett., 2001, 496, 44-48), qui est un dérivé de DRB pour augmenter sa spécificité pour la sous-unité alpha de la CK2. Toutefois, ces analogues de substrats de kinases (ATP) peuvent inhiber l'activité d'autres protéines connues ou inconnues, mettant en œuvre l'ATP cellulaire. La spécificité de tels produits et notamment du TBB étant incertaine, leur utilisation est exclue *in vivo*,

- des oligonucléotides anti-sens dirigés contre les sous-unités de la CK2 (Demande américaine US 2002/147163 et Brevet américain US 6 455 307 au nom de ISIS PHARMACEUTICALS INC ; Ulloa et al., EMBO, 1993, 12, 1633-1640 ; Faust et al., Head & Neck, 2000, 22, 341-346) ; l'inhibition de l'activité CK2, démontrée uniquement *in vitro*, est partielle, transitoire et nécessite des doses très élevées d'oligonucléotides anti-sens (plusieurs dizaines à plusieurs centaines de µg/ml en fonction de la sensibilité des cellules).

Il ressort de ce qui précède qu'il n'existe pas de molécules capables d'inhiber spécifiquement la protéine kinase CK2 de façon efficace. En outre, il n'existe pas de modèle *in vitro* ou *in vivo* permettant une analyse fonctionnelle de chacune des sous-unités CK2, utile pour le criblage de molécules capables de moduler l'activité de la protéine kinase CK2.

Il a été montré que des fragments d'ARN double-brin complémentaires d'un ARNm sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans des cellules eucaryotes, d'inhiber fortement l'expression du gène correspondant en détruisant cet ARNm. Ce phénomène dénommé interférence ARN (pour une revue voir : Biofutur, 2002, volume 228, pages 52-61 ; Voorhoeve et al., TIBS, 2003, 21, 2-4) a été mis en évidence et particulièrement bien étudié chez les plantes et les invertébrés (*Caenorhabditis elegans*, drosophile) et l'on peut raisonnablement supposer l'existence d'un mécanisme semblable chez les animaux supérieurs, puisque l'interférence ARN a également été observée dans des cellules humaines en culture. Toutefois, il a été montré que chez les invertébrés le phénomène était même capable de se propager à l'ensemble de l'organisme et de persister après la division cellulaire, ce qui n'a pas été observé chez les animaux supérieurs.

Des petits fragments d'ARN double-brin, longs de 21 à 25 nucléotides, sont les véritables déclencheurs de l'inhibition. Ces siRNA peuvent pénétrer

directement dans les cellules végétales et vraisemblablement aussi dans celles d'invertébrés. Chez la drosophile, il a été montré que les siRNA s'intègrent dans des complexes moléculaires appelés RISC (*RNA-induced silencing complex*). Avec l'intervention d'une hélicase et d'ATP comme source d'énergie, ces complexes exposent les brins du siRNA. Si la séquence génétique du siRNA correspond à un fragment d'un gène qui s'exprime naturellement dans la cellule, l'ARN interférant exposé par le complexe RISC va rencontrer un ARN messenger porteur d'une séquence exactement complémentaire et les deux molécules vont s'associer. La présence du brin de siRNA provoque l'intervention d'enzymes qui vont sectionner l'ARN messenger à l'endroit où il est lié au siRNA. Les deux parties de l'ARN messenger sectionné, privées de l'une de leurs terminaisons habituelles, sont identifiées comme incomplètes et détruites par la cellule. L'ARN messenger ciblé ne peut plus jouer son rôle et commander la synthèse d'une protéine. C'est ainsi que s'explique le caractère extrêmement spécifique de l'interférence ARN (R. Agami, *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6, 829-834 ; il n'y a réaction que si la séquence d'une vingtaine de nucléotides du siRNA a son homologue exact sur un ARN messenger. La probabilité qu'un segment d'ADN, pris au hasard, corresponde à un siRNA donné est de l'ordre de $1/4$ à la puissance 21 (21 nucléotides pouvant prendre chacun 4 «valeurs»), soit une chance sur plus de 4 milliards.

Ce phénomène d'inhibition spécifique de l'expression des gènes, ouvre des perspectives intéressantes dans le domaine de la génomique fonctionnelle et de la recherche pharmaceutique, respectivement pour identifier rapidement la fonction de nouveaux gènes, et pour sélectionner rapidement les gènes cibles et les médicaments candidats.

Ainsi, des siRNA spécifiques des ADNc codant pour des protéines virales ou cellulaires et capables d'inhiber la production des protéines correspondantes ont été décrits (p24 de HIV, gD de HSV, IL-12 ; Demande Internationale PCT WO 00/63364).

Toutefois, aucun siRNA capable d'inhiber spécifiquement l'expression des sous-unités de la protéine kinase CK2 n'a été décrit.

De manière surprenante, les Inventeurs ont isolé des siRNA spéci-

fiques des transcrits des sous-unités α , α' et β de la CK2 capables de bloquer sélectivement l'expression de la sous-unité α , de la sous-unité α' ou de la sous-unité β de la protéine kinase CK2 dans des cellules, et ce de façon efficace, spécifique et durable. De tels siRNA qui présentent un effet inhibiteur prolongé, de l'ordre de 72 heures, à des concentrations faibles (de l'ordre de 20 nM, *in vitro*), sont utiles comme médicament pour le traitement des cancers. En effet, une concentration de 20 nM de siRNA inhibe plus de 80% de l'expression des sous-unités de la protéine kinase CK2 (détectée par Western Blot) et des ARNm correspondants (quantification par RT-PCR au light-cycler) après 48 h dans des cellules humaines (MCF7, HeLa ou fibroblastes 3T3).

En outre, ces ARN qui inhibent spécifiquement l'expression de la sous-unité α , α' ou β de la protéine kinase CK2 représentent également des outils pour l'analyse fonctionnelle du rôle respectif de chaque unité de la CK2 et le criblage de molécules capables de moduler (activer ou inhiber) l'activité d'une ou plusieurs de ces sous-unités de la CK2.

La présente invention a ainsi pour objet, un oligonucléotide double-brin formé de deux brins de 19 à 23 nucléotides, chaque brin étant constitué de 5' en 3' par une séquence de 17 à 21 ribonucléotides et deux désoxyribo- ou ribonucléotides, les séquences d'ARN de 17 à 21 ribonucléotides desdits brins étant complémentaires et les deux nucléotides des extrémités 3' étant protrusifs, caractérisé en ce que la séquence d'ARN du brin sens ou brin positif est celle d'un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α , α' ou β d'une protéine kinase CK2 sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un fragment correspondant à un oligonucléotide qui inhibe plus de 80 % de l'expression de la sous-unité correspondante, en culture cellulaire, à une concentration comprise entre 1 et 200 nM, de préférence inférieure à 20 nM,

b) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α inclus entre les positions 18-74, 259-279, 565-585, 644-664, 720-750, 808-831 et 863-885, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité α de la CK2 de souris n° NM_007787 ou humaine n° NM_001895,

c) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α' inclus entre les positions 49-69, 132-142, 306-326, 367-387, 427-447, 451-471, 595-615, 735-755, 827-847, 868-888, 949-969 et 988-1008, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité α' de la CK2 de souris NM_009974 ou humaine n° NM_001896,

d) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité β inclus entre les positions 80-100, 116-127, 164-208, 369-389, 400-420, 527-591 et 613-643, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité β de la CK2 humaine n° NM_001320 ou de souris n° NP_034105, et

e) un fragment de 17 à 21 nucléotides présentant au moins 80 % d'identité avec les fragments définis en a), b), c) et d).

L'oligonucléotide double-brin selon l'invention correspond à un siRNA capable d'inhiber l'expression de la sous-unité correspondante de la protéine kinase CK2 ; la séquence d'ARN de 17 à 21 nucléotides du brin sens ou brin positif est celle de la séquence-cible du transcrit de la sous-unité α , α' ou β de la protéine kinase CK2 de mammifère.

L'invention englobe les oligonucléotides naturels, synthétiques, semi-synthétiques ou recombinants ciblant la protéine kinase CK2 de n'importe quel organisme, notamment eucaryote. Compte tenu des informations données en référence aux séquences humaines et de souris, l'Homme du métier est en mesure de trouver les positions équivalentes dans les séquences d'autres organismes eucaryotes, notamment de mammifères, accessibles dans les bases de données de séquences

Conformément à l'invention, l'identité d'une séquence oligonucléotidique par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de nucléotides qui sont identiques, lorsque les séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide double-brin, ladite séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) un fragment d'une sous-unité α défini par l'équivalent ARN de la séquence SEQ ID NO: 1 à 13,

b) un fragment d'une sous-unité α' défini par l'équivalent ARN de

la séquence SEQ ID NO: 14 à 25,

c) un fragment d'une sous-unité β défini par l'équivalent ARN de la séquence SEQ ID NO: 26 à 40, et

5 d) une séquence telle que définie en a), b) ou c), tronquée d'un ou deux nucléotides à son extrémité 5' et/ou 3'.

Au sens de la présente invention, on entend par équivalent ARN d'une séquence d'ADN, la séquence dans laquelle les désoxyribonucléotides (a, g, c, t) de la dite séquence d'ADN sont remplacés par les ribonucléotides (a, g, c, u).

10 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide double-brin, chacun des brins comprend un groupement phosphate en 5' et un groupement hydroxyle en 3'.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide double-brin, lesdits nucléotides protrusifs des extrémités 3' sont sélectionnés dans le groupe constitué par les paires tt et aa.

15 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide double-brin, il est formé de deux brins de 19 ou 20 nucléotides.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation dudit oligonucléotide double-brin, il comprend un brin sens défini par la séquence SEQ ID NO:67 ou 68.

20 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit oligonucléotide double-brin, il est formé de deux brins de 21 à 23 nucléotides.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation dudit oligonucléotide double-brin, il comprend un brin sens défini par la séquence SEQ ID NO:41 à 66, 69 à 81, 83 et 86.

25 Les Tableaux I, II et III suivants résument les propriétés des différents oligonucléotides de séquences SEQ ID NO:1 à 86.

TABLEAU I : séquences cibles et SiRNA α

Nom et n°	séquence cible de souris (séquence sens)	SiRNA	Taille	Tm	%GC	Position/codon ATG NM_007787 souris et NM_001895 de la séquence humaine	Homologie Hu*/souris
CK2 α 1	cagaccccgagagtactggga (SEQ ID NO:3)	gaccccgagaguacugggatt ttcuggggcucucaugacccu (SEQ ID NO:44)	21	61.5	57	54	2
CK2 α 2	aacacacacagaccccgagag (SEQ ID NO:2)	aaucacacagaccucgagtt ttuuaugugugucuggagcuc (SEQ ID NO:43)	21	61.7	52.4	46	2
CK2 α 3	aagcagggccagagtttacac (SEQ ID NO:1)	gcagggccagaguuacactt ttcguccggucucaaaugug (SEQ ID NO:41)	21	58.6	52.4	18	0
CK2 α 4	aacacacacagaccccgagag (SEQ ID NO:2)	cacacacagaccccgagagtt ttgugugugucuggggcucuc (SEQ ID NO:42)	21	59.3	52.4	46	2
CK2 α 5	aatttgagaggtgggccaac (SEQ ID NO:4)	uuugagagggggcccaactt ttaaacucuccacccggguug (SEQ ID NO:45)	21	59.8	52.4	259	2
CK2 α 6	aatgtccgagttgcttctga (SEQ ID NO:5)	uguccgaguugcuucucgatt ttacaggcucaacgaagagcu (SEQ ID NO:46)	21	58.8	47.6	565	1
CK2 α 7	aacgatatctgggcagacac (SEQ ID NO:10)	cgauaucuugggcagacactt ttgcuauagaaccgcugug (SEQ ID NO:51)	21	57.9	47.6	808	1
CK2 α 8	aaaaccagcatctgtcagcc (SEQ ID NO:12)	aaccagcaccuugucagcctt ttuuggucguggaacgaucgg (SEQ ID NO:53)	21	60.3	47.6	863	2
CK2 α 9	aaccagcatctgtcagccct (SEQ ID NO:13)	ccagcaccuugucagccutt ttggucguggaacagucggga (SEQ ID NO:54)	21	62.0	52.4	865	2
CK2 α 10	aggatagccaaggttctgg (SEQ ID NO:9)	aggauagccaagguucuggtt ttuccuaucgguuccuugacc (SEQ ID NO:50)	21	58.9	47.6	730	0
CK2 α 11	tggtgaggatagccaaggttc (SEQ ID NO:8)	gugaggauagccaagguuctt ttcacuccuaucgguuccaag (SEQ ID NO:49)	21	57.1	47.6	725	0
CK2 α 12	tcagtggtaggatagcca (SEQ ID NO:7)	caguuggugaggauagccatt ttgucaaccacuccuaucggu (SEQ ID NO:48)	21	58.8	47.6	720	0
CK2 α 13	gatatctgggcagacactcc (SEQ ID NO:11)	uauauugggcagacacucctt ttauagaacccgucugugagg (SEQ ID NO:52)	21	58.6	47.6	811	1
CK2 α 14	tgtggagcttgggtgtatgc (SEQ ID NO:6)	uggagcuuggguugaugctt ttaccucgaaccaacauacg (SEQ ID NO:47)	21	61.8	47.8	644	1

* Hu = humain

- 5 NB : l'ATG est en position 1 de la séquence de souris n° NM_007787 et en position 277 de la séquence humaine n° NM_001895.

TABLEAU II : séquences cibles et SiRNA α'

Nom	Séquence cible humaine (séquence sens)	SiRNA	TAILLE	Tm	%GC	Position	Homologie Hu/souris
CK2 α' 1	aacagtctgaggagccgcgag (SEQ ID NO:14)	cagccugaggagccgcgagtt ttgucggacuccucggcguc (SEQ ID NO:55)	21	66.5	66,7	49	1 mésappa- riement
CK2 α' 2	aaaacttggtcggggcaagta (SEQ ID NO:15)	aacuuggucggggcaaguatt ttuugaaccagcccgguucau (SEQ ID NO:56)	21	59.5	47,6	132	2 mésappa- riements
CK2 α' 3	aaaggaccctgtgtcaaagac (SEQ ID NO:16)	aggaccugugucaagactt ttuccugggacacaguucug (SEQ ID NO:57)	21	62.4	47,6	306	1
CK2 α' 4	aagcaactctaccagatcctg (SEQ ID NO:17)	gcaacucuaccagauccugtt ttcguugagauggucuaggac (SEQ ID NO:58)	21	55.8	47,6	367	0
CK2 α' 5	aaagctctggattactgccac (SEQ ID NO:18)	agcucuggauuacugccactt ttucgagaccuaaugacggug (SEQ ID NO:59)	21	58.2	47,6	427	0
CK2 α' 6	aagggaatcatgcacagggat (SEQ ID NO:19)	gggaaucaugcacagggautt ttccuuaguacguguccua (SEQ ID NO:60)	21	62.8	47,6	451	0
CK2 α' 7	aagggaccagagctccttgg (SEQ ID NO:20)	gggaccagagcuccuugutt ttccugugucgaggacuc (SEQ ID NO:61)	21	65.2	57,1	595	1
CK2 α' 8	aattgccaaggttctggggac (SEQ ID NO:21)	uugccaagguucuggggactt ttaacguucaagaccccug (SEQ ID NO:62)	21	61.5	52,4	735	2 mais aux extrémités
CK2 α' 9	aacattcacggaagcgctggg (SEQ ID NO:22)	cauucacggaagcgugggtt ttguaagugccuucgaccc (SEQ ID NO:63)	21	66.4	57,1	827	1
CK2 α' 10	aacaggcacctgtcagcccg (SEQ ID NO:23)	caggcaccuugucagccgtt ttguccguggaacagucgggc (SEQ ID NO:64)	21	61.0	61,9	868	2 dont un le dernier nt
CK2 α' 11	aaagaggccatggagcacc a (SEQ ID NO:24)	agaggccauggagcaccatt ttucuccguaccucgugggu (SEQ ID NO:65)	21	68.4	57,1	949	0
CK2 α' 12	aaggagcagtcacagccttgt (SEQ ID NO:25)	ggagcaguccagccuugutt ttccucgucagggucgaaca (SEQ ID NO:66)	21	64.6	57,1	988	0

NB : l'ATG est en position 99 de la séquence de souris n° NM_009974 et en position
5 164 de la séquence humaine n° NM_001896.

TABLEAU III : séquences cibles et SiRNA β

Nom	Séquence cible humaine (séquence sens)	SiRNA	Taille	Tm	%GC	Position	Homologie hu/souris
CK2 β 1	aagacaacccaaccagagtg (SEQ ID NO:32)	aagacaacccaaccagagug ccuucuguuggguuggucuc (SEQ ID NO:73)	21	61.2	52.4	188	0 mésappa- riement
CK2 β 2	tcaatgagcagggtccctcact (SEQ ID NO:27)	aaugagcaggguccucacu aguuacucguccaggagag (SEQ ID NO:68)	19	62	52.4	116	0
CK2 β 3	acctggagcctgatgaagaac (SEQ ID NO:29)	accuggagccugaugaagaac ccuggaccucggacuacuucu (SEQ ID NO:70)	21	60.5	52.4	164	1
CK2 β 4	tggagcctgatgaagaactgg (SEQ ID NO:30)	uggagccugaugaagaacugg ggaccucggacuacuucuuga (SEQ ID NO:71)	21	62.5	52.3	167	1
CK2 β 5	ggagcctgatgaagaactgga (SEQ ID NO:31)	ggagccugaugaagaacugga gaccucggacuacuucuugac (SEQ ID NO:72)	21	62.5	52.3	168	1
CK2 β 6	caatgagcagggtccctcacta (SEQ ID NO:28)	caaugagcaggguccucacua gaguacucguccaggagag (SEQ ID NO:69)	21	60.1	52.3	117*	0
CK2 β 7	ccaagagacctgccaaccagt (SEQ ID NO:35)	ccaagagaccugccaaccagu cgguucucuggacgguuggu (SEQ ID NO:76)	21	62	47.6	527	1
CK2 β 8	cctgtcggacatcccagggtga (SEQ ID NO:33)	ccugucggacaucccagguga ccggacagccuguagggucca (SEQ ID NO:74)	21	62.2	52.3	369	3
CK2 β 9	agcaactcaagagcccagtc (SEQ ID NO:38)	agcaacucaagagcccaguc ggucguugaaguucggguc (SEQ ID NO:79)	21	60.8	52.3	613	0
CK2 β 10	ccaggctctacggtttcaaga (SEQ ID NO:36)	ccaggctctacggtttcaaga cgguccgagaguccaaaguu (SEQ ID NO:77)	21	60.5	52.3	554	1
CK2 β 11	agagcccagtcagacgattc (SEQ ID NO:40)	agagcccagtcagacgattc gttctcgggucaguucgucua (SEQ ID NO:81)	21	60.6	52.3	623	0
CK2 β 12	aactcaagagcccagtcag (SEQ ID NO:39)	aactcaagagcccagtcag gcuugaaguucugggucagu (SEQ ID NO:80)	21	60.8	52.3	616	0
CK2 β 13	aagctctactgcccgaagtgc (SEQ ID NO:34)	gcucuacugcccgaagugctt ttcgagaugacggguucacg (SEQ ID NO:75)	21	63	52.4	400	1
CK2 β 14	aagatccatccgatggcctac (SEQ ID NO:37)	gauccauccgauggccuactt ttcuagguaggcuaccggaug (SEQ ID NO:78)	21	62.3	42.9	571	2
CK2 β 15	aagactacatccaggacaat (SEQ ID NO:26)	gacuacaucaggacaattt ttcugauguaggucguua (SEQ ID NO:67)	20	52.1	38.1	80	0
CK2 β 16	aagactacatccaggacaat (SEQ ID NO:26)	aagacuacaucaggacaatt ttuucugauguaggucguuu (SEQ ID NO: 83)	21				
CK2 β 17	aagactacatccaggacaat (SEQ ID NO:26)	ugaagacuacaucaggacuu uuacuucugauguaggucug (SEQ ID NO: 86)	21				

NB : l'ATG est en position 341 de la séquence humaine n° NM_001320.

La présente invention a également pour objet un oligonucléotide simple-brin, caractérisé en ce qu'il est défini par le brin antisens ou brin négatif de l'oligonucléotide double-brin tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'oligonucléotide double-brin ou simple-brin tel que défini ci-dessus, il est stabilisé.

Les oligonucléotides stabilisés sont connus de l'Homme du métier ; ils peuvent être stabilisés, notamment par incorporation de bases modifiées au cours de la synthèse *in vitro* ou par modifications des bases préalablement incorporées dans lesdits oligonucléotides. Des exemples de ces modifications sont présentés au Tableau IV.

La présente invention a également pour objet un précurseur de l'oligonucléotide double-brin ou simple-brin tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

- a) un oligonucléotide simple-brin correspondant au brin sens ou antisens tel que défini ci-dessus,
- b) un oligodésoxynucléotide (ADN) double-brin correspondant aux brins sens et/ou antisens de l'oligonucléotide double-brin tel que défini ci-dessus,
- c) un oligoribonucléotide en épingle à cheveu comprenant les séquences des brins d'ARN sens et anti-sens telles que définies ci-dessus, et
- d) un ADN double-brin formé d'un brin sens correspondant à l'équivalent ADN de l'oligoribonucléotide défini en c) et d'un brin antisens complémentaire du précédent.

Au sens de la présente invention, on entend par équivalent ADN d'une séquence d'ARN, la séquence dans laquelle les ribonucléotides (a, g, c, u) de la dite séquence d'ADN sont remplacés par les désoxyribonucléotides (a, g, c, t).

Les précurseurs sont utiles pour produire les oligonucléotides simple-brin et double-brin selon la présente invention par les techniques classiques de synthèse oligonucléotidique ou de transcription à l'aide d'un vecteur recombinant.

Chacun des brins du siRNA peut-être synthétisé séparément puis les brins complémentaires sont hybridés de façon à former des duplexes d'ARN. Alternativement, les brins du siRNA peuvent être synthétisés simultanément.

Le siRNA peut également être produit sous forme d'une molécule d'ARN en épingle à cheveu selon le principe décrit dans Brummelkamp et al., Science, 2002, 296, 550-553. La molécule d'ARN en épingle à cheveu est ensuite clivée dans les cellules transfectées par ladite molécule d'ARN ou transduites par un vecteur de transcription approprié, pour libérer le siRNA. Cette molécule d'ARN en épingle à cheveu comprend les séquences des deux brins du siRNA séparées par une courte séquence d'oligoribonucléotides non-complémentaires d'environ 3 à 12 nucléotides formant une boucle d'environ 5 à 15 nucléotides. Par exemple, une boucle d'environ 10 nucléotides est formée à partir d'une courte séquence d'environ 8 ribonucléotides et de deux nucléotides issus de l'extrémité 3' du brin sens du siRNA.

Les oligonucléotides simple-brin et double-brin selon la présente invention peuvent être, soit produits par synthèse chimique ou par transcription *in vitro* (tube à essai) ou en culture cellulaire, puis administrés *in vivo*, soit ils sont produits *in vivo* dans les cellules d'un organisme qui ont été modifiées par un vecteur de transcription (thérapie génique) ou un ADN codant lesdits siRNA (transgénèse).

La synthèse chimique est réalisée selon la méthode classique des phosphoramidites, décrite notamment dans Elbashir et al., Nature, 2001, 411, 494-498). Par exemple, chacun des brins du siRNA peut-être synthétisé selon chimie β -cyanoéthyl phosphoramidite sur support solide utilisant le 2'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) comme groupement protecteur de la position 2' du ribonucléotide. D'autres groupements protecteur peuvent être utilisés ; le silyl ether qui protège l'extrémité 5'-hydroxyl du ribonucléotide peut-être utilisé en combinaison avec un orthoester labile qui protège le 2'-hydroxyl du ribonucléotide.

La transcription à l'aide d'un vecteur recombinant met en œuvre un ADN double-brin codant pour l'un au moins ou les deux brins du siRNA ou bien un ARN en épingle à cheveu tel que défini ci-dessus. De tels ADN clonés dans des vecteurs d'expression appropriés, permettent la transcription séparée ou simultanée des deux brins complémentaires dudit siRNA, comme décrit respectivement dans Sadher et al. Biochem. Int., 1987 : 14, 1015 et dans le brevet européen EP 0618 966 au nom de CIS BIO INTERNATIONAL. Par exemple, le procédé de préparation d'ARN double-brin décrit dans le brevet européen EP 0618 966 met en œuvre une

matrice d'ADN fixée sur un support qui permet la transcription simultanée des deux brins d'ARN en ARN double-brin après une étape d'amplification (PCR) de la séquence ADN cible. L'ARN double-brin obtenu peut être fixé sur un support et plusieurs séquences différentes de siRNA peuvent être analysées simultanément.

5 L'invention a également pour objet une cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un précurseur tel que défini ci-dessus sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription appropriés, notamment un promoteur, inductible ou non et un terminateur de transcription.

10 L'invention a également pour objet un vecteur eucaryote ou procaryote comprenant un insert constitué par un oligonucléotide tel que défini ci-dessus ; de préférence ledit vecteur est un vecteur d'expression dans lequel est inséré une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

Ces vecteurs sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes. De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte. On peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt ou bien des vecteurs non-viraux tels que des plasmides.

25 De manière préférée, ledit vecteur est un vecteur à ADN (plasmide ou virus recombinant) comprenant un oligodésoxynucléotide double-brin tel que défini ci-dessus ; un tel vecteur codant un siRNA tel que défini ci-dessus est utile pour la production *in vitro* ou *in vivo* desdits siRNA.

30 Des vecteurs particulièrement bien adaptés à l'expression stable des siRNA, sont notamment ceux décrits dans T.R. Brummelkamp et al., Science, 2002, 296, 550-553.

La présente invention a également pour objet des cellules eucaryotes ou procaryotes modifiées par un oligonucléotide, un précurseur, une cassette d'expression ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un animal non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules modifiées par un oligonucléotide, un précurseur, une cassette d'expression ou un vecteur tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide, un précurseur ou un vecteur codant ledit siRNA tels que définis ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Lesdits oligonucléotides (oligonucléotide double-brin (siRNA), ou simple-brin ou précurseur des précédents), isolés ou insérés dans un vecteur tel que défini ci-dessus, sont introduits dans des cellules-cibles soit par diffusion passive, soit en utilisant des méthodes physiques telles que l'électroporation ou la microinjection, soit en les associant à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique, tels que des transporteurs comme les nanotransporteurs, des liposomes, des lipides ou des polymères cationiques, tel que le phosphate de calcium (kit Sigma ref. CA-PHOS), l'amine (kit Ambion réf. 4502), la lipofectamine (kit Polyplus-transfection, réf. 101-05) ou le fugène-6 (Roche, réf 1815-091). En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

Dans certains cas, il n'est pas nécessaire d'associer les oligonucléotides selon l'invention avec une substance permettant leur passage à travers la membrane plasmique, dans la mesure où les siRNA sont assez petits pour diffuser librement dans les différents compartiments cellulaires. Ils peuvent agir au niveau du cytoplasme mais aussi à la membrane nucléaire, voire dans le noyau.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit oligonucléotide, ledit précurseur ou ledit vecteur sont associés à au moins une substance permettant le passage de la membrane plasmique tels que des transporteurs

comme les nanotransporteurs, des liposomes, des lipides ou des polymères cationiques.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit oligonucléotide, ledit précurseur ou ledit vecteur sont associés à au moins
5 une substance permettant le ciblage dans des cellules, des tissus ou des organes spécifiques tels que des anticorps et des peptides, notamment des peptides aptes à passer la barrière hématoencéphalique comme les peptides Pep:TransTM (<http://www.syntem.com/english/techpeptrans.html>). D'autres peptides peuvent
10 avantageusement être utilisés pour faciliter la transfection de siRNA au travers de la membrane plasmique des cellules ; les anticorps décrits dans Lu Z.R. et al. (Nature Biotechnol., 1999, 17, 1101-1104) peuvent notamment être utilisés pour cibler des cellules cancéreuses.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, ledit oligonucléotide, ledit précurseur ou ledit vecteur sont associés à au
15 moins un agent anti-viral ou anti-cancéreux.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition, elle comprend un mélange de plusieurs oligonucléotides ou de leurs précurseurs, ou bien un ou plusieurs vecteurs d'expression dudit mélange d'oligonucléotides, et notamment un mélange comprenant au moins un oligonucléotide spécifique de la
20 sous-unité α , au moins un oligonucléotide spécifique de la sous-unité α' et au moins un oligonucléotide spécifique de la sous-unité β .

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un oligonucléotide, d'un précurseur ou d'un vecteur tels que définis ci-dessus pour la
préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

25 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un oligonucléotide, d'un précurseur ou d'un vecteur tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies virales.

La présente invention a également pour objet un produit contenant
30 au moins un oligonucléotide, un précurseur ou un vecteur tels que définis ci-dessus et un principe actif anti-cancéreux, en tant que préparation combinée pour une utilisation

simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement du cancer.

La présente invention a également pour objet un produit contenant au moins un oligonucléotide, un précurseur ou un vecteur tels que définis ci-dessus et
5 un principe actif anti-viral, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement des maladies virales.

La posologie utile varie en fonction de l'affection à traiter, de la voie et du rythme d'administration, ainsi que de la nature et du poids de l'espèce à traiter
10 (humaine ou animale). Les oligonucléotides sont utilisés par voie digestive (orale, sublinguale), parentérale ou locale. Ils peuvent se présenter sous la forme de comprimés, simples ou dragéifiés, de gélules, de granules, de sirop, de suppositoires, de préparations injectables, de pommades, de crèmes, de gels, d'aérosol, lesquels sont préparés selon les méthodes usuelles. Dans ces formes galéniques, les oligonucléotides sont
15 incorporés à des excipients habituellement employés dans des compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

20 *In vitro*, les concentrations qui peuvent être utilisées chez le rat sont comprises entre 10 nM et 200 μ M ; les doses *in vivo* peuvent donc être comprises entre 1 μ g et 20 mg/kg. Les doses correspondantes chez l'homme peuvent être déduites de ces informations.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un oligonucléotide, d'un précurseur, d'un vecteur, des cellules eucaryotes ou procaryotes modifiées
25 ou d'un animal transgénique, tels que définis ci-dessus pour le criblage de molécules capables de moduler sélectivement l'activité des sous-unités α , α' ou β de la protéine CK2 ; par exemple, il est possible d'inhiber spécifiquement l'expression d'une des sous-unités *in vivo* ou *in vitro* et ainsi de cribler des molécules actives sur l'autre sous-unité ; de telles molécules représentent des médicaments potentiels, utiles pour la
30

prévention et le traitement des pathologies liées à une dérégulation (augmentation ou diminution) de l'activité de la protéine kinase CK2 dans les cellules.

On peut citer, à titre d'exemple de pathologie liée à une dérégulation de l'activité de la CK2, l'infertilité masculine en l'absence de CK2 α' non compensée par α qui est absente dans les cellules germinales au dernier stade de différenciation des spermatogonies (Xu et al., Nature Gen., 1999, 23, 118-121).

Par rapport aux oligonucléotides anti-sens de l'art antérieur, les oligonucléotides et notamment les siRNA selon l'invention présentent les avantages suivants :

- ils sont stables *in vitro* et *in vivo*,
- ils sont actifs à des concentrations faibles (de l'ordre de 20 nM *in vitro*) et inhibent de façon très efficace (> 80 % d'inhibition) l'expression et par conséquent l'activité de la protéine kinase CK2 dans les cellules,
- ils présentent un effet prolongé, jusqu'à 6 jours.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du siRNA correspondant à la séquence SEQ ID NO: 26 selon la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'analyse par immunofluorescence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase CK2, par un siRNA ciblant la séquence SEQ ID NO:26 (β si) ; les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti-CK2 β , un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (fluorescence verte), puis contre-colorées à l'iodure de propidium (fluorescence rouge). L'inhibition est mesurée par le rapport du nombre de cellules CK2 β positives (fluorescence verte) sur le nombre total de cellules (fluorescence rouge). Les valeurs représentent les moyennes de deux mesures indépendantes \pm SEM. Une concentration finale de 100 nM de siRNA inhibe 90 % de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase CK2.

- la figure 2 illustre la cinétique d'inhibition de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase CK2 en présence d'un siRNA synthétique (siRNA- β) ciblant la séquence SEQ ID NO:26.

- la figure 3 illustre l'analyse comparative de l'inhibition de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase CK2 par un siRNA CK2 β synthétique (séquence sens SEQ ID NO: 83 et antisens SEQ ID NO: 84) ou exprimé dans les cellules-cibles par un vecteur recombinant (pSUPERsiRNA) produisant un ARN en épingle à cheveu (SEQ ID NO: 85) correspondant au siRNA de séquence sens SEQ ID NO: 86 et antisens SEQ ID NO: 87,

- la figure 4 illustre l'amélioration des séquences siRNA. Des cellules humaines (lignée MCF7) et murines (lignée NIH 3T3) ont été transfectées avec différents siRNA ciblant la sous-unité α (CK2 α 3, CK2 α 7, CK2 α 5) et présentant ou non des misappariements avec l'ARN-cible, et un siRNA contrôle (ctrl). Les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti-CK2 α , un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (fluorescence verte), puis contre-colorées à l'iodure de propidium (fluorescence rouge). L'inhibition de l'expression de la sous-unité α est mesurée par le rapport du nombre de cellules CK2 α positives (fluorescence verte) sur le nombre total de cellules (fluorescence rouge).

EXEMPLE 1 : Expression d'un oligoribonucléotide selon l'invention dans les cellules-cibles modifiées par un vecteur recombinant

a) Une séquence d'ADN (gatccctgaagactacatccaggacttcaagagagtccctggatgtagtcttcatttttgaaa, SEQ ID NO:82) a été clonée dans le vecteur pSUPER selon les conditions décrites dans Brummelkamp TR et al. (Science, 2002, 296, 5567, 550-3). Le vecteur recombinant ainsi obtenu (pSUPER siRNA) permet l'expression d'un siRNA- β ou CK2 β ciblant la séquence SEQ ID NO:26, à partir d'un transcrit en épingle à cheveux (figure 3),

b) Des cellules NIH 3T3 sont transfectées avec les vecteurs obtenus en a) selon un protocole de transfection à l'aide de Fugène 6 (Roche).

EXEMPLE 2 : Préparation d'oligoribonucléotides synthétiques, éventuellement stabilisés.

a) Les deux brins d'ARN sont synthétisés selon des méthodes connues (méthode au phosphoramidite ARN, voir notamment Elbashir S.M. et al., Nature, 2001, 411, 494-498).

b) Pour les stabiliser, il est avantageux de les modifier en insérant des nucléotides modifiés dans les deux brins d'ARN, au cours de la synthèse *in vitro*.

Le Tableau IV ci-après illustre des exemples de nucléotides

modifiés.

	Nucléotide modifié	Première Application	Seconde Application
5	2' F-CTP	Résistance à la nucléase	
	2' F-UTP	Résistance à la nucléase	
	2' NH ₂ -CTP	Résistance à la nucléase	
	2' NH ₂ -UTP	Résistance à la nucléase	
	2' N ₃ -CTP	Résistance à la nucléase	Modification post-synthèse
10	2' N ₃ -UTP	Résistance à la nucléase	Modification post-synthèse
	2-thio CTP	Réticulation UV	
	2-thio UTP	Hybridation modifiée	Réticulation UV
	4-thio UTP	Hybridation modifiée	Réticulation UV
	5-iodo CTP	Réticulation UV	
	5-iodo UTP	Réticulation UV	
15	5-bromo UTP	Réticulation UV	
	2-chloro ATP	Réticulation UV	
	Adenosine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
	Cytidine 5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
	Guanosine -5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
	Uridine -5'-(1-thiotriphosphate)	Instable chimiquement	résistance à la nucléase
	Pseudo-UTP		
20	5-(3-aminoallyl)-UTP	Modification post-synthèse	
	5-(3-aminoallyl)-dUTP	Modification post-synthèse	

De tels nucléotides sont notamment disponibles chez Ambion (<http://www.ambion.com>).

EXEMPLE 3 : Inhibition de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase

25 CK2 par un siRNA synthétique.

Des fibroblastes 3T3 ont été cultivés en goutte de 5 μ l (2000 cellules) dans du milieu de culture complet, dans les puits d'une lame pour immuno-fluorescence (40 puits d'un diamètre de 2 mm ; lame en super téflon, référence 74890.01 (PROLABO)). Les cellules 3T3 ont été transfectées à l'aide du kit de trans-
 30 fection siPort® (AMBION), avec une concentration finale de 5, 20, 50 ou 100 nM de siRNA ciblant la séquence SEQ ID NO: 26, dans un volume de 5 μ l, ou non-

transfectées, puis les cellules ont été incubées pendant 2 jours à 37 °C. Les cellules ont ensuite été lavées et fixées à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (4 % dans PBS). Les cellules sont ensuite colorées à l'iodure de propidium et marquées à l'aide d'un anticorps primaire anti-sous-unité β de la protéine CK2 (anticorps β c ; Filhol et al 1994 Biochem Biophys Res Commun. 198 660-5) et d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore, tel que le cyanamide 3. La fluorescence est analysée à l'aide d'un scanner (Genomic Solution) et l'inhibition de l'expression de la protéine kinase CK2 est exprimée par le rapport du nombre de cellules exprimant la protéine kinase CK2 (cellules rouges marquées par l'anticorps β c) sur le nombre total de cellules (cellules bleues marquées à l'iodure de propidium).

Les résultats sont illustrés à la figure 1 et montrent qu'une concentration de 20 nM de siRNA inhibe 90 % de l'expression de la sous-unité β de la protéine kinase CK2.

EXEMPLE 4 : Etude de l'inhibition de l'expression de la β CK2 par un siRNA synthétique ou produit dans les cellules-cibles modifiées par un vecteur d'expression

Les cellules NIH 3T3 transfectées, soit par un siRNA- β ciblant la séquence SEQ ID NO:26) (20 nM), soit par le vecteur d'expression correspondant (pSUPER siRNA), sont cultivées pendant les temps indiqués à la figure 2. Après lavage dans PBS, elles sont lysées dans du tampon TDG (Tris, HCl pH 7,4 10 mM, Glycérol 0,1 %, DTT 1 mM, NaCl 500 mM Triton X-100 0,1 %) et centrifugées 15 min à 15000g à 4°C. Le surnageant est dosé pour son contenu en protéines et 40 μ g sont analysés par SDS-PAGE. Les protéines sont alors transférées sur membrane PVDF. Après saturation de la membrane dans du PBS contenant 0,05% Tween 20 et 3% de BSA pendant 1 heure, la sous-unité CK2 β est révélée à l'aide de l'anticorps β C.

On observe une inhibition de l'expression de la sous-unité β de la protéine CK2 avec le siRNA synthétique ou produit par un vecteur d'expression (figure 3) ; cette inhibition est observée dès 24h comme le montre la cinétique d'inhibition avec le siRNA synthétique (figures 2 et 3).

Exemple 5 : Amélioration des séquences siRNA

L'inhibition de l'expression de la sous-unité α de la protéine CK2 humaine ou murine par différents siRNA (CK2 α 3, CK2 α 7, CK2 α 5) présentant ou non des misappariements avec l'ARN-cible a été analysée par immunofluorescence comme décrit à l'exemple 3. Les siRNA sont spécifiques du transcrit murin et présentent 0 (CK2 α 3), 1 (CK2 α 7) ou 2 (CK2 α 5) misappariement(s) avec le transcrit humain (Tableau I) ; pour α 7, le misappariement est dans la partie 5' de la séquence cible, alors que pour α 5, le misappariement est dans la partie 5' de la séquence cible

Des cellules humaines (lignée MCF7) et murines (lignée NIH 3T3) ont été transfectées avec différents siRNA ciblant la sous-unité α (CK2 α 3, CK2 α 7, CK2 α 5) ou avec un siRNA contrôle (ctrl). Les cellules ont été marquées avec un anticorps primaire anti-CK2 α , un anticorps secondaire couplé à la fluorescéine (fluorescence verte), puis contre-colorées à l'iodure de propidium (fluorescence rouge). L'inhibition de l'expression de la sous-unité α a été mesurée par le rapport du nombre de cellules CK2 α positives (fluorescence verte) sur le nombre total de cellules (fluorescence rouge).

Les résultats montrent que la présence de misappariement avec l'ARN-cible diminue l'efficacité des siRNA (figure 4 ; voir α 5 dans la lignée humaine par rapport à la lignée murine).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Oligonucléotide double-brin formé de deux brins de 19 à 23 nucléotides, chaque brin étant constitué de 5' en 3' par une séquence de 17 à 21 ribonucléotides et deux désoxyribo- ou ribonucléotides, les séquences d'ARN de 17 à 21 ribonucléotides desdits brins étant complémentaires et les deux nucléotides des extrémités 3' étant protrusifs, caractérisé en ce que la séquence d'ARN du brin sens ou brin positif est celle d'un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α , α' ou β d'une protéine kinase CK2 sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un fragment correspondant à un oligonucléotide qui inhibe plus de 80 % de l'expression de la sous-unité correspondante, en culture cellulaire, à une concentration comprise entre 1 et 200 nM, de préférence inférieure à 20 nM,

b) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α inclus entre les positions 18-74, 259-279, 565-585, 644-664, 720-750, 808-831 et 863-885, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité α de la CK2 de souris n° NM_007787 ou humaine n° NM_001895,

c) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité α' inclus entre les positions 49-69, 132-142, 306-326, 367-387, 427-447, 451-471, 595-615, 735-755, 827-847, 868-888, 949-969 et 988-1008, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité α' de la CK2 de souris NM_009974 ou humaine n° NM_001896,

d) un fragment d'un transcrit d'une sous-unité β inclus entre les positions 80-100, 116-127, 164-208, 369-389, 400-420, 527-591 et 613-643, à partir du codon ATG, en référence à la séquence d'ADNc de la sous-unité β de la CK2 humaine n° NM_001320 ou de souris n° NP_034105, et

e) un fragment de 17 à 21 bases présentant au moins 80 % d'identité avec les fragments définis en a), b), c) et d).

2°) Oligonucléotide double-brin selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) un fragment d'une sous-unité α défini par l'équivalent ARN de la séquence SEQ ID NO: 1 à 13,

b) un fragment d'une sous-unité α' défini par l'équivalent ARN de

la séquence SEQ ID NO: 14 à 25,

c) un fragment d'une sous-unité β défini par l'équivalent ARN de la séquence SEQ ID NO: 26 à 40, et

5 d) une séquence telle que définie en a), b) ou c), tronquée d'un ou deux nucléotides à son extrémité 5'et/ou 3'.

3°) Oligonucléotide double-brin selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que chacun des brins comprend un groupement phosphate en 5' et un groupement hydroxyle en 3'.

10 4°) Oligonucléotide double-brin selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que lesdits nucléotides protrusifs des extrémités 3' sont sélectionnés dans le groupe constitué par les paires tt et aa.

5°) Oligonucléotide double-brin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est formé de deux brins de 19 ou 20 nucléotides.

15 6°) Oligonucléotide double-brin selon la revendication 5, caractérisé en ce que le brin sens est défini par la séquence SEQ ID NO:67 ou 68.

7°) Oligonucléotide double-brin selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est formé de deux brins de 21 à 23 nucléotides.

20 8°) Oligonucléotide double-brin selon la revendication 7, caractérisé en ce que le brin sens est défini par la séquence SEQ ID NO:41 à 66, 69 à 81, 83 et 86.

25 9°) Oligonucléotide simple-brin, caractérisé en ce qu'il est défini par le brin antisens ou brin négatif de l'oligonucléotide double-brin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8.

10°) Oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est stabilisé.

30 11°) Précurseur de l'oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un oligonucléotide simple-brin correspondant au brin sens ou anti-sens de l'oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10,

b) un oligodésoxynucléotide double-brin correspondant aux brins sens et/ou antisens de l'oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10,

c) un oligoribonucléotide en épingle à cheveu comprenant les séquences des brins sens et anti-sens de l'oligonucléotide double-brin selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et 10,

d) un oligodésoxynucléotide double-brin formé d'un brin sens correspondant à l'oligoribonucléotide défini en c) et d'un brin antisens complémentaire du précédent.

12°) Cassette d'expression, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un précurseur tel que défini à la revendication 11, sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription appropriés.

13°) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend la cassette telle que définie à la revendication 12.

14°) Vecteur d'expression selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur à ADN comprenant un précurseur ADN tel que défini en b) et d) de revendication 11 inclus dans une cassette d'expression.

15°) Cellule eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, un précurseur selon la revendication 11, une cassette d'expression selon la revendication 12 ou un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14.

16°) Animal non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend des cellules modifiées par un précurseur selon la revendication 11, une cassette d'expression selon la revendication 12 ou un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14.

17°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, un précurseur selon la revendication 11 ou un vecteur d'expression selon la

revendication 13 ou la revendication 14, et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

18°) Composition pharmaceutique selon la revendication 17, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide, précurseur ou vecteur sont associés à au moins une substance permettant le passage de la membrane plasmique.

19°) Composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou la revendication 18, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide, précurseur ou vecteur sont associés à au moins une substance permettant le ciblage dans des cellules, des tissus ou des organes.

20°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisée en ce que le dit oligonucléotide, précurseur ou vecteur sont associés à au moins un agent anti-viral ou anti-cancéreux.

21°) Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 17 à 20, caractérisée en ce qu'elle comprend un mélange de plusieurs oligonucléotides ou de leurs précurseurs, ou bien un ou plusieurs vecteurs d'expression dudit mélange d'oligonucléotides, notamment un mélange comprenant au moins un oligonucléotide spécifique de la sous-unité α , au moins un oligonucléotide spécifique de la sous-unité α' et au moins un oligonucléotide spécifique de la sous-unité β .

22°) Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, d'un précurseur selon la revendication 11 ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement du cancer.

23°) Utilisation d'un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, d'un précurseur selon la revendication 11 ou d'un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies virales.

24°) Produit contenant au moins un oligonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, un précurseur selon la revendication 11 ou un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14 et un principe

actif anti-cancéreux, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement du cancer.

25°) Produit contenant au moins un oligoribonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, un précurseur selon la revendication 11 ou un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14 et un principe actif anti-viral, en tant que préparation combinée pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la prévention et/ou le traitement des maladies virales.

26°) Utilisation d'un oligoribonucléotide selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, d'un précurseur selon la revendication 11, d'un vecteur d'expression selon la revendication 13 ou la revendication 14, de cellules eucaryotes ou procaryotes selon la revendication 15 ou d'un animal non-humain transgénique selon la revendication 16, pour le criblage de molécules capables de moduler l'activité des sous-unités α , α' ou β de la protéine kinase CK2.

1/4

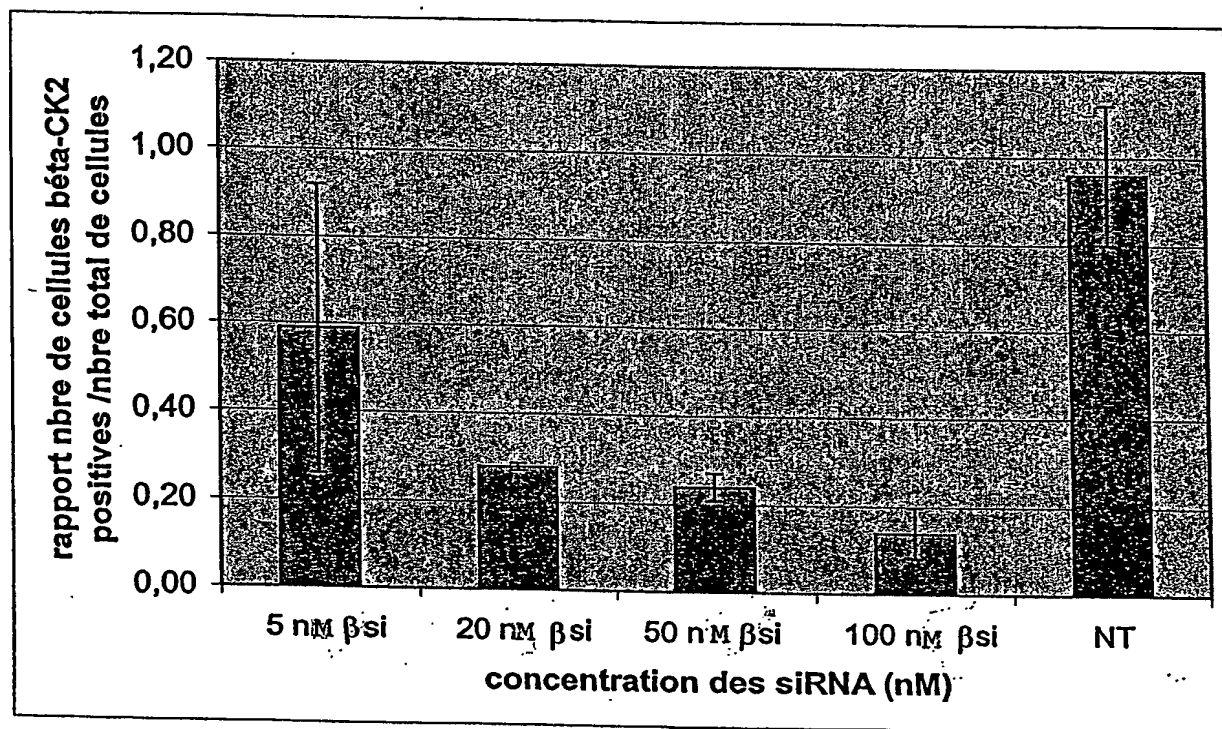
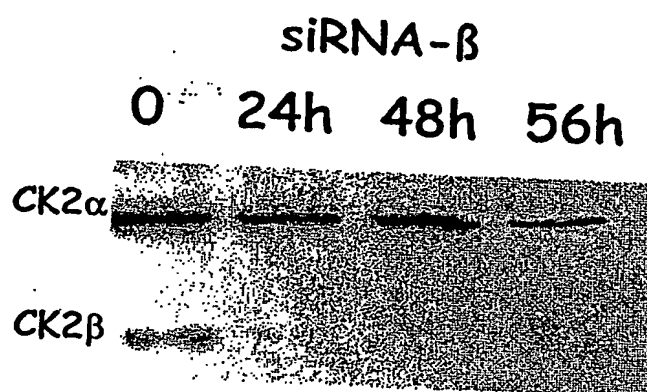


Figure 1

2/4



> 90% inhibition

FIGURE 2

A

siRNA-β AAGACUACAUCAGGACAAdTdT (SEQ ID NO:83)
dTdTUUCUGAUGUAGGUCCUGUU (SEQ ID NO: 84)

ARN en épingle à cheveu
(SEQ ID NO: 85) UGAAGACUACAUCAGGAC UUCA
produit par pSUPER siRNA UUAUCUUCUGAUGUAGGUCCUG AAGA

B

pSUPER siRNA

siRNA-β

0 24h 48h 56h

β ctrl

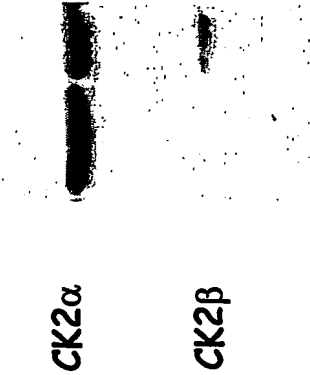
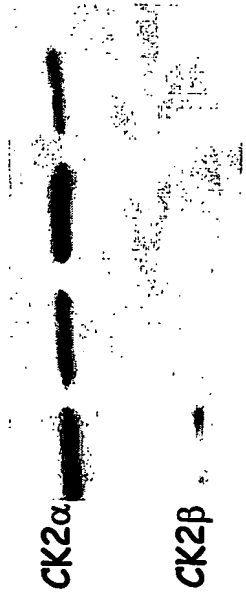


Figure 3

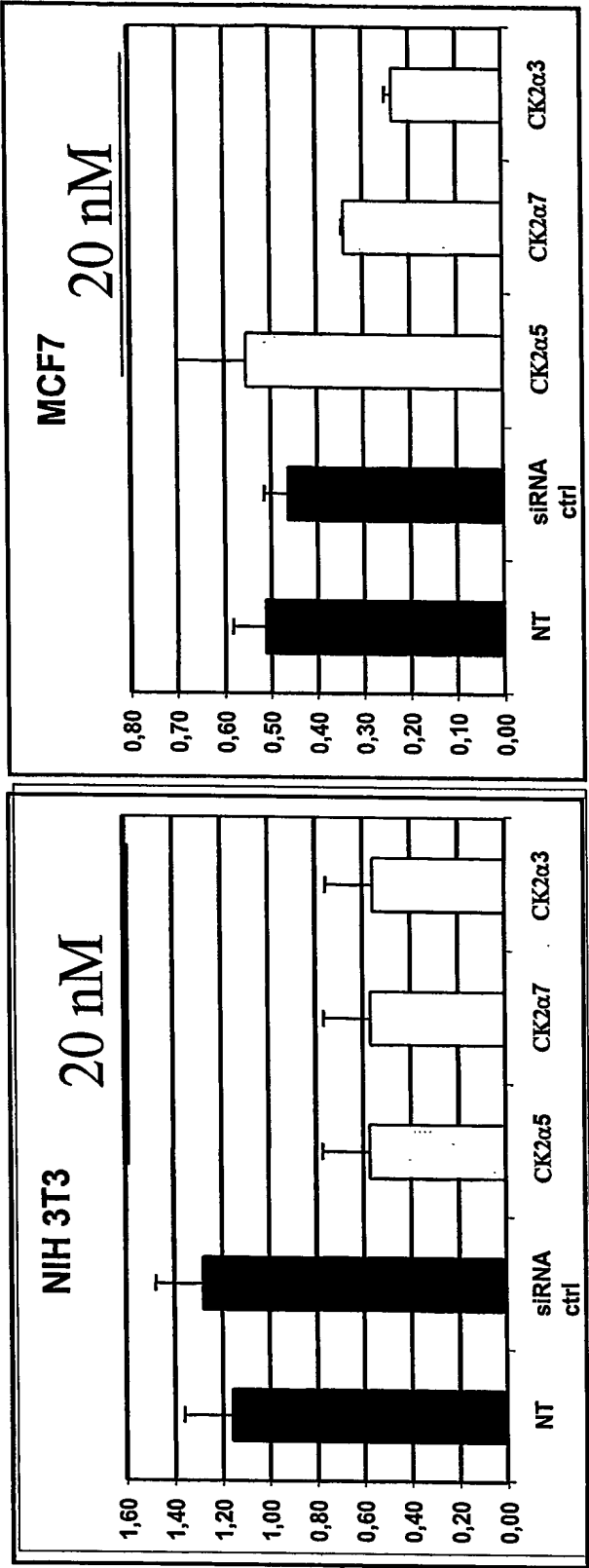


Figure 4

263PCT96-SEQ.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
SCHAACK, Béatrice
COCHET, Claude
FILHOL-COCHET, Odile
FOUQUE, Brigitte

<120> PETITS ARN INTERFERENTS SPECIFIQUES DES SOUS-UNITES ALPHA, ALPHA', ET
BETA DE LA PROTEINE KINASE CK2 ET LEURS APPLICATIONS

<130> F263PCT96

<150> FR0308032

<151> 2003-07-02

<160> 87

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> mus musculus

<400> 1
aagcagggcc agagtttaca c 21

<210> 2
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 2
aacacacaca gaccccgaga g 21

263PCT96-SEQ.ST25

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

cagaccccga gagtactggg a

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

aatttgagag gtgggcccaa c

21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

aatgtccgag ttgcttctcg a

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

tgtggagctt gggttgtatg c

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

tcagttggtg aggatagcca	263PCT96-SEQ.ST25	20
<210> 8		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 8 tggtgaggat agccaagggtt c		21
<210> 9		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 9 aggatagcca aggttcttg		19
<210> 10		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 10 aacgatatct tgggcagaca c		21
<210> 11		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		
<400> 11 gatatcttgg gcagacactc c		21
<210> 12		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Mus musculus		

263PCT96-SEQ.ST25

<400> 12
aaaaccagca tcttgtcagc c 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13
aaccagcatc ttgtcagccc t 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 14
aacagtctga ggagccgcga g 21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
aaaacttggt cggggcaagt a 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 16
aaaggaccct gtgtcaaaga c 21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

263PCT96-SEQ.ST25

<400> 17
aagcaactct accagatcct g

21

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
aaagctctgg attactgcca c

21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
aagggaatca tgcacagggga t

21

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
aagggaccag agctccttgt g

21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21
aattgccaag gttctgggga c

21

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

263PCT96-SEQ.ST25

<213> Homo sapiens

<400> 22

aacattcacg gaagcgctgg g

21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

aacaggcacc ttgtcagccc g

21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

aaagaggcca tggagcacc a

21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

aaaggagcagt cccagccttg t

21

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

aagactacat ccaggacaat

20

<210> 27

<211> 21

263PCT96-SEQ.ST25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

tcaatgagca ggtccctcac t

21

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

caatgagcag gtccctcact a

21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

acctggagcc tgatgaagaa c

21

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

tggagcctga tgaagaactg g

21

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ggagcctgat gaagaactgg a

21

<210> 32

263PCT96-SEQ.ST25

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

aagacaaccc caaccagagt g

21

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

cctgtcggac atcccaggtg a

21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

aagctctact gcccgaagtg c

21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

ccaagagacc tgccaaccag t

21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

ccaggctcta cggtttcaag a

21

263PCT96-SEQ.ST25

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

aagatccatc cgatggccta c

21

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

agcaacttca agagcccagt c

21

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

aacttcaaga gcccagtcaa g

21

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

agagcccagt caagacgatt c

21

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

263PCT96-SEQ.ST25

<223> brin sens siRNA
<400> 41
gcagggccag aguuuacact t 21

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 42
cacacacaga ccccgagagt t 21

<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 43
aauacacaca gaccucgagt t 21

<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 44
gacccccgaga guacugggat t 21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

263PCT96-SEQ.ST25

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 45

uuugagaggu gggcccaact t

21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 46

uguccgaguu gcuucucgat t

21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 47

uggagcuugg guugaugct t

21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 48

caguugguga ggauagccat t

21

<210> 49

<211> 21

263PCT96-SEQ.ST25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 49

gugaggauag ccaagguuct t

21

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 50

aggauagcca agguucuggt t

21

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 51

cgauaucuug ggcagacact t

21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 52

uauauugggc agacacucct t

21

263PCT96-SEQ.ST25

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 53

aaccagcacc uugucagcct t

21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 54

ccagcaccuu gucagcccut t

21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 55

cagccugagg agccgcgagt t

21

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

263PCT96-SEQ.ST25

<400> 56
aacuuggucg gggcaaguat t

21

<210> 57

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 57
aggaccucgu gucaaagact t

21

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 58
gcaacucuac cagauccugt t

21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 59
agcucuggau uacugccact t

21

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

263PCT96-SEQ.ST25

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 60

gggaaucaug cacagggaut t

21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 61

gggaccagag cuccuugugt t

21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 62

uugccaaggu ucuggggact t

21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 63

cauucacgga agcgcugggt t

21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

263PCT96-SEQ.ST25

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 64

caggcacuu gucagcccgt t

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 65

agaggccaug gagcacccat t

21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 66

ggagcagucc cagccuugut t

21

<210> 67

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 67

gacuacaucc aggacaautt

20

<210> 68

263PCT96-SEQ.ST25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 68

aaugagcagg ucccucacu

19

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 69

caaugagcag gucccucacu a

21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 70

accuggagcc ugaugaagaa c

21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 71

uggagccuga ugaagaacug g 263PCT96-SEQ.ST25 21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 72
ggagccugau gaagaacugg a 21

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 73
aagacaaccc caaccagagu g 21

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> brin sens siRNA
<400> 74
ccugucggac aucccaggug a 21

<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

263PCT96-SEQ.ST25

<223> brin sens siRNA

<400> 75

gcucuacugc cccaagugct t

21

<210> 76

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 76

ccaagagacc ugccaaccag u

21

<210> 77

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 77

ccaggctcta cggtttcaag a

21

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 78

gauccauccg auggccuact t

21

<210> 79

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

263PCT96-SEQ.ST25

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 79

agcaacuca agagcccagu c

21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 80

aacttcaaga gcccagtcaa g

21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 81

agagcccagt caagacgatt c

21

<210> 82

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 82

gatcccctga agactacatc caggacttca agagagtcct ggatgtagtc ttcatttttg

60

gaaa

64

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

263PCT96-SEQ.ST25

<213> ARTIFICIAL SEQUENCE

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 83

aagacuacau ccaggacaat t

21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin antisens siRNA

<400> 84

uuguccugga uguagucuut t

21

<210> 85

<211> 50

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> ARN en épingle à cheveu

<400> 85

ugaagacuac auccaggacu ucaagagaag uccuggaugu agucuucuu

50

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin sens siRNA

<400> 86

ugaagacuac auccaggacu u

21

<210> 87

263PCT96-SEQ.ST25

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> brin antisens siRNA

<400> 87

guccuggaug uagucucau u

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001729

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/11 C12N15/63 A61K31/713

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ULLOA L ET AL: "DEPLETION OF CASEIN KINASE II BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE PREVENTS NEURITOGENESIS IN NEUROBLASTOMA CELLS" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 12, no. 4, 1993, pages 1633-1640, XP002952118 ISSN: 0261-4189 cited in the application	9-11
Y	page 1639, paragraphs 2,4	1-26
Y	US 2002/147163 A1 (FREIER SUSAN M ET AL) 10 October 2002 (2002-10-10) page 4, paragraphs 32,33 page 8, paragraph 58 SEQ ID NOs: 24, 26, 47	1-26

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 January 2005

Date of mailing of the international search report

02/02/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Durrenberger, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001729

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 455 307 B1 (FREIER SUSAN M ET AL) 24 September 2002 (2002-09-24) column 14, lines 54-67 SEQ ID NO: 44	1-26
Y	FAUST RUSSELL A ET AL: "Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2-alpha inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro" HEAD AND NECK, vol. 22, no. 4, July 2000 (2000-07), pages 341-346, XP009027373 ISSN: 1043-3074 cited in the application page 342 page 343, right-hand column, paragraph 3	1-26
Y	WO 00/63364 A (AMERICAN HOME PROD ;PACHUK CATHERINE (US); SATISHCHANDRAN C (US)) 26 October 2000 (2000-10-26) cited in the application the whole document	1-26
Y	VOORHOEVE P M ET AL: "Knockdown stands up" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 2-4, XP004397628 ISSN: 0167-7799 cited in the application the whole document	1-26
Y	READ M L ET AL: "RNA-based therapeutic strategies for cancer" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 01 MAY 2003 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 5, 1 May 2003 (2003-05-01), pages 627-638, XP002314125 ISSN: 1354-3776 page 627 - page 629, right-hand column, paragraph 2	1-26
Y	PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, November 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 the whole document	1-26

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/001729

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELBASHIR S M ET AL: "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in <i>Drosophila melanogaster</i> embryo lysate" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 23, 3 December 2001 (2001-12-03), pages 6877-6888, XP002225998 ISSN: 0261-4189 the whole document	1-26
Y	BRANTL S: "Antisense-RNA regulation and RNA interference" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA . GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1575, no. 1-3, 3 May 2002 (2002-05-03), pages 15-25, XP004356720 ISSN: 0167-4781 the whole document	1-26
A	BUCHOU THIERRY ET AL: "La proteine kinase CK2, une enzyme qui cultive la difference." M-S (MEDECINE SCIENCES), vol. 19, no. 6-7, June 2003 (2003-06), - July 2003 (2003-07) pages 709-716, XP009027436 ISSN: 0767-0974 the whole document	
A	AHMED KHALIL ET AL: "Joining the cell survival squad: An emerging role for protein kinase CK2" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 12, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 226-230, XP002273461 ISSN: 0962-8924 the whole document	
A	VALERO EMMANUELLE ET AL: "Modulation of the protein kinase CK2 activity by a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of its beta regulatory subunit" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, no. 1, 1997, pages 178-182, XP002273462 ISSN: 0006-291X the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/001729

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002147163 A1	10-10-2002	WO 02062818 A2	15-08-2002
US 6455307 B1	24-09-2002	WO 02062951 A2	15-08-2002
WO 0063364 A	26-10-2000	AU 4472100 A	02-11-2000
		BR 0009884 A	08-01-2002
		CA 2370628 A1	26-10-2000
		CN 1375004 T	16-10-2002
		EP 1171586 A2	16-01-2002
		JP 2002542263 T	10-12-2002
		WO 0063364 A2	26-10-2000
		US 2004138168 A1	15-07-2004
		US 2004147476 A1	29-07-2004
		US 2004198690 A1	07-10-2004
		US 2004266721 A1	30-12-2004
		US 2005004067 A1	06-01-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/001729

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/11 C12N15/63 A61K31/713

Selon la Classification Internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ULLOA L ET AL: "DEPLETION OF CASEIN KINASE II BY ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE PREVENTS NEURITOGENESIS IN NEUROBLASTOMA CELLS" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 12, no. 4, 1993, pages 1633-1640, XP002952118 ISSN: 0261-4189 cité dans la demande	9-11
Y	page 1639, alinéas 2,4	1-26
Y	US 2002/147163 A1 (FREIER SUSAN M ET AL) 10 octobre 2002 (2002-10-10) page 4, alinéas 32,33 page 8, alinéa 58 SEQ ID NOs: 24, 26, 47	1-26
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 janvier 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/02/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Durrenberger, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/001729

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 6 455 307 B1 (FREIER SUSAN M ET AL) 24 septembre 2002 (2002-09-24) colonne 14, ligne 54-67 SEQ ID NO: 44	1-26
Y	----- FAUST RUSSELL A ET AL: "Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2-alpha inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro" HEAD AND NECK, vol. 22, no. 4, juillet 2000 (2000-07), pages 341-346, XP009027373 ISSN: 1043-3074 cité dans la demande page 342 page 343, colonne de droite, alinéa 3	1-26
Y	----- WO 00/63364 A (AMERICAN HOME PROD ;PACHUK CATHERINE (US); SATISHCHANDRAN C (US)) 26 octobre 2000 (2000-10-26) cité dans la demande le document en entier	1-26
Y	----- VOORHOEVE P M ET AL: "Knockdown stands up" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 1, janvier 2003 (2003-01), pages 2-4, XP004397628 ISSN: 0167-7799 cité dans la demande le document en entier	1-26
Y	----- READ M L ET AL: "RNA-based therapeutic strategies for cancer" EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 01 MAY 2003 UNITED KINGDOM, vol. 13, no. 5, 1 mai 2003 (2003-05-01), pages 627-638, XP002314125 ISSN: 1354-3776 page 627 - page 629, colonne de droite, alinéa 2	1-26
Y	----- PARRISH S ET AL: "Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA interference" MOLECULAR CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 6, no. 5, novembre 2000 (2000-11), pages 1077-1087, XP002226298 ISSN: 1097-2765 le document en entier	1-26
	----- -/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De de internationale No
PCT/FR2004/001729

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ELBASHIR S M ET AL: "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in <i>Drosophila melanogaster</i> embryo lysate" EMBO JOURNAL, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 20, no. 23, 3 décembre 2001 (2001-12-03), pages 6877-6888, XP002225998 ISSN: 0261-4189 le document en entier</p>	1-26
Y	<p>BRANTL S: "Antisense-RNA regulation and RNA interference" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA . GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1575, no. 1-3, 3 mai 2002 (2002-05-03), pages 15-25, XP004356720 ISSN: 0167-4781 le document en entier</p>	1-26
A	<p>BUCHOU THIERRY ET AL: "La protéine kinase CK2, une enzyme qui cultive la différence." M-S (MEDECINE SCIENCES), vol. 19, no. 6-7, juin 2003 (2003-06), - juillet 2003 (2003-07) pages 709-716, XP009027436 ISSN: 0767-0974 le document en entier</p>	
A	<p>AHMED KHALIL ET AL: "Joining the cell survival squad: An emerging role for protein kinase CK2" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 12, no. 5, mai 2002 (2002-05), pages 226-230, XP002273461 ISSN: 0962-8924 le document en entier</p>	
A	<p>VALERO EMMANUELLE ET AL: "Modulation of the protein kinase CK2 activity by a synthetic peptide corresponding to the N-terminus of its beta regulatory subunit" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 232, no. 1, 1997, pages 178-182, XP002273462 ISSN: 0006-291X le document en entier</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Informations relatives aux membres de familles de brevets

Deposition internationale No

PCT/FR2004/001729

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2002147163 A1	10-10-2002	WO 02062818 A2	15-08-2002
US 6455307 B1	24-09-2002	WO 02062951 A2	15-08-2002
WO 0063364 A	26-10-2000	AU 4472100 A	02-11-2000
		BR 0009884 A	08-01-2002
		CA 2370628 A1	26-10-2000
		CN 1375004 T	16-10-2002
		EP 1171586 A2	16-01-2002
		JP 2002542263 T	10-12-2002
		WO 0063364 A2	26-10-2000
		US 2004138168 A1	15-07-2004
		US 2004147476 A1	29-07-2004
		US 2004198690 A1	07-10-2004
		US 2004266721 A1	30-12-2004
		US 2005004067 A1	06-01-2005

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☒ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.